

DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen630364>

Оригинальное исследование



Длина теломер в трофэктодерме и внутренней клеточной массе бластоцист человека: сравнительный анализ и оценка влияющих на нее факторов

А.В. Тихонов, О.А. Ефимова, М.И. Крапивин, О.В. Малышева, Е.М. Комарова,
А.В. Голубева, А.А. Пендина

Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

АННОТАЦИЯ

Актуальность. Изучение длины теломер и влияющих на нее факторов в раннем эмбриональном развитии человека имеет как фундаментальное, так и прикладное значение.

Цель — сравнительная оценка длины теломер в компартментах бластоцист человека, а также анализ ассоциации длины теломер с качеством бластоцист, наличием у них генетического дисбаланса и возрастом пациенток, от которых получены бластоцисты.

Материалы и методы. Исследование проведено на образцах трофэктодермы и внутренней клеточной массы 41 бластоцисты человека, у 26 из которых был выявлен генетический дисбаланс при проведении преимплантационного генетического тестирования и верификации его результатов. Из образцов готовили микроскопические препараты. Теломеры выявляли в интерфазных ядрах методом количественной флуоресцентной гибридизации *in situ* (quantitative fluorescence *in situ* hybridization, Q-FISH).

Результаты. В трофэктодерме теломеры оказались длиннее, чем во внутренней клеточной массе, при этом длина теломер в обоих компартментах варьировала от бластоцисты к бластоцисте. Длина теломер не различалась между бластоцистами с генетическим дисбалансом и без такового как в трофэктодерме, так и во внутренней клеточной массе. Отмечена тенденция к уменьшению длины теломер в компартментах бластоцист с увеличением возраста пациенток, от которых получены бластоцисты, однако статистически достоверной корреляции не установлено. Длина теломер во внутренней клеточной массе, но не в трофэктодерме бластоцист ассоциирована с их качеством на основании оценки по Гарднеру: для бластоцист среднего качества характерны более длинные теломеры, чем для бластоцист высокого качества.

Выводы. Длинные теломеры в трофэктодерме могут быть необходимы для имплантации и дальнейшей плацентации. Длину теломер можно рассматривать как один из модификаторов эффекта аномалий кариотипа и других негативных факторов: наследование эмбрионом длинных теломер, по всей видимости, дает ему преимущество в развитии даже при наличии генетического дисбаланса или морфологических нарушений. При этом имплантация является важным периодом негативной селекции эмбрионов с «неудачными» сочетаниями длины теломер, кариотипа и морфологии.

Ключевые слова: длина теломер; бластоциста человека; анеуплоидия; материнский возраст; трофэктодерма; внутренняя клеточная масса; вспомогательные репродуктивные технологии.

Как цитировать

Тихонов А.В., Ефимова О.А., Крапивин М.И., Малышева О.В., Комарова Е.М., Голубева А.В., Пендина А.А. Длина теломер в трофэктодерме и внутренней клеточной массе бластоцист человека: сравнительный анализ и оценка влияющих на нее факторов // Экологическая генетика. 2024. Т. 22. № 4. С. 369–381. DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen630364>

DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen630364>
Original Study Article

Telomere length in trophoctoderm and inner cell mass of human blastocysts: comparative analysis and assessment of influencing factors

Andrei V. Tikhonov, Olga A. Efimova, Mikhail I. Krapivin, Olga V. Malysheva, Evgeniia M. Komarova, Arina V. Golubeva, Anna A. Pendina

D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: The study of telomere length and influencing factors in early human development has both fundamental and applied importance.

AIM: A comparative assessment of telomere length in the compartments of human blastocysts, and the analysis of the telomere length association with the quality of blastocysts, genetic imbalance and the maternal age.

MATERIALS AND METHODS: The study was performed on trophoctoderm and inner cell mass samples of 41 human blastocysts, 26 of which were genetically imbalanced according to preimplantation genetic testing and verification of its results. The microscope slides were prepared for further telomere detection in interphase nuclei by quantitative fluorescence *in situ* hybridization (Q-FISH).

RESULTS: Telomeres in trophoctoderm were longer than in inner cell mass, with their length varied from blastocyst to blastocyst. Telomere length in either trophoctoderm or inner cell mass did not differ between genetically balanced and imbalanced blastocysts. There was a tendency towards a decrease in telomere length in the blastocyst compartments with increasing maternal age, however, a statistically significant correlation was not confirmed. The telomere length in the inner cell mass, but not in the trophoctoderm, was associated with blastocysts' quality based on the Gardner grade: medium quality blastocysts had longer telomeres than high quality blastocysts.

CONCLUSIONS: Long telomeres in trophoctoderm may be necessary for implantation and subsequent placentation. Telomere length can be considered among modifiers of the effects of karyotype abnormalities and other negative factors: the inheritance by an embryo of long telomeres apparently gives it a developmental advantage even when genetically imbalanced or has poor morphology. Implantation seems to be an important checkpoint for negative selection of embryos with "unsuccessful" combinations of telomere length, karyotype, and morphology.

Keywords: telomere length; human blastocyst; aneuploidy; maternal age; trophoctoderm; inner cell mass; assisted reproductive technologies.

To cite this article

Tikhonov AV, Efimova OA, Krapivin MI, Malysheva OV, Komarova EM, Golubeva AV, Pendina AA. Telomere length in trophoctoderm and inner cell mass of human blastocysts: comparative analysis and assessment of influencing factors. *Ecological genetics*. 2024;22(4):369–381. DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen630364>

Received: 16.04.2024

Accepted: 31.07.2024

Published online: 30.12.2024

АКТУАЛЬНОСТЬ

В доимплантационный период развития эмбриона происходит ряд ключевых событий, определяющих успех дальнейшей реализации программы онтогенеза: первые деления и установление клеточных контактов, эпигенетическое репрограммирование генома и ремоделирование хроматина, активация генома эмбриона и первичная специализация клеток. Итогом доимплантационного этапа развития является формирование бластоцисты, содержащей два компартмента клеток: трофэктодерму (ТЭ) и внутреннюю клеточную массу (ВКМ).

Интенсивное деление клеток эмбриона, необходимое для развития способной к имплантации бластоцисты и дальнейшему формированию всех типов клеток и тканей организма, требует поддержания определенной длины теломер. Теломеры являются нуклеопротеиновыми структурами, состоящими из варьирующего числа tandemных повторов гексануклеотидов, белков шелтеринового комплекса и теломерной РНК [1, 2]. Располагаясь на концах линейных хромосом, теломеры защищают их от эндонуклеазной активности, негомологичной рекомбинации и концевых слияний [3].

С каждым клеточным делением из-за феномена концевой недорепликации теломеры неизбежно укорачиваются [4]. Незапрограммированное укорочение теломер может происходить под негативным воздействием внешних факторов [5–7]. Критическое уменьшение длины теломер приводит к гибели клетки [8]. Поддержание и увеличение длины теломер возможно за счет запрограммированной слаженной работы теломеразы [9] и/или альтернативных механизмов удлинения, основанных на гомологичной рекомбинации теломерных последовательностей [10]. Длинные теломеры связывают с увеличенной продолжительностью жизни [11, 12], сниженным риском некоторых типов рака [13–15] и высокой эффективностью экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) [16, 17].

Учитывая критическую роль теломер для жизнеспособности клетки, можно утверждать, что корректная регуляция их длины в период делений дробления эмбриона человека является необходимым условием его нормального развития. При этом очевидно важным этапом является установление определенной длины теломер в компартментах бластоцисты при первичной специализации клеток на ТЭ и ВКМ и подготовке бластоцисты к имплантации и активному росту. Информация о длине теломер в бластоцистах человека крайне скудна, что связано с труднодоступностью материала для исследования, а также методическими трудностями анализа теломер в малоклеточных образцах.

Цель исследования — сравнительная оценка длины теломер в компартментах бластоцист человека, а также анализ ассоциации длины теломер с качеством бластоцист, наличием у них генетического дисбаланса и возрастом пациенток, от которых получены бластоцисты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы исследования

Материалом исследования послужили бластоцисты человека, полученные от 22 супружеских пар, обратившихся в ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта» для лечения бесплодия методом ЭКО. Для контролируемой стимуляции овуляции были использованы рекомбинантные и/или мочевины гонадотропины по описанной ранее методике [18]. Оплодотворение *in vitro* и культивирование эмбрионов до стадии бластоцисты выполняли по стандартным протоколам [19, 20]. Проводили биопсию бластомеров или ТЭ для преимплантационного генетического тестирования (ПГТ) эмбрионов на анеуплоидии или структурные перестройки в зависимости от медицинских назначений для конкретной супружеской пары. Бластоцисты криоконсервировали, а на биоптатах выполняли ПГТ методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization, FISH), методом сравнительной геномной гибридизации на микроматрицах (array comparative genomic hybridization, aCGH) или секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS). Для настоящего исследования были отобраны бластоцисты с генетическим дисбалансом по результатам ПГТ, а также бластоцисты без генетического дисбаланса, от криохранения которых пациенты отказались.

Бластоцисты использованы в исследовании с информированного письменного согласия пациентов. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта», протокол № 120 от 21.07.2022.

Приготовление микроскопических препаратов из клеток ТЭ и ВКМ бластоцист человека

Криоконсервированные бластоцисты оттаивали в среде Китазано (Thawing Media, Kitazato, Япония) согласно рекомендациям производителя. Затем их помещали в среду для культивирования G-TL (10145, Vitrolife, Швеция) на 12–16 ч (5 % O₂, 6 % CO₂). Для оценки качества бластоцист использовали шкалу Гарднера [21]. С бластоцист удаляли блестящую оболочку и разделяли с помощью лазера Octax (Vitrolife GmbH, Германия) на ТЭ и ВКМ. Полученные образцы ТЭ и ВКМ фиксировали на предметных стеклах, используя стандартный протокол с собственными модификациями, многократно применяемый в наших предыдущих исследованиях [20, 22, 23].

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH)

Для подтверждения наличия в бластоцистах генетического дисбаланса, на интерфазных ядрах ТЭ и ВКМ проводили FISH с ДНК-зондами (Vysis, Abbott Molecular, США), специфичными к локусам хромосом, по которым был выявлен дисбаланс при проведении ПГТ. Алгоритм верификации результатов ПГТ подробно описан в нашем предыдущем исследовании [24].

Для выявления теломерных районов на препаратах интерфазных ядер бластоцист проводили FISH с теломерными ДНК-зондами (K532611–8, DAKO, Дания). Все этапы гибридизации проводили согласно протоколу, рекомендованному фирмой-производителем, с собственными незначительными модификациями, описанными ранее [20].

После получения цифровых фотоизображений интерфазных ядер бластоцист с гибридизационными сигналами к теломерным последовательностям хромосом на тех же препаратах проводили детекцию локуса 21q22.13–q22.2 (реперный участок при измерении теломерных сигналов) методом FISH с использованием ДНК-зонда Vysis LSI 21 (Abbott Molecular, США). Все этапы гибридизации проводили согласно рекомендациям фирмы-производителя с описанными ранее собственными модификациями [25, 26].

Получение цифровых фотоизображений и оценка интенсивности свечения теломерных и LSI 21 гибридизационных сигналов

Цифровые фотоизображения интерфазных ядер с гибридизационными сигналами получали с помощью микроскопа Leica DM2500 (Leica Microsystems CMS GmbH, Германия), оборудованного камерой Leica DFC345 FX и программного обеспечения Leica Application Suite V3. Все цифровые фотоизображения получали при одинаковых настройках: время экспозиции 1,3 с, усиление $\times 1$, гамма 2,0.

Оценку интенсивности флуоресцентных сигналов к теломерным районам и к локусу 21q22.13–q22.2 проводили с помощью программного обеспечения Image J 1.52n, позволяющего измерить средний уровень свечения в выделенной вручную области фотоизображения.

Статистический анализ данных

Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism, Version 6.01, используя тест Д'Агостино–Пирсона для проверки

распределения на нормальность, *T*-критерий Вилкоксона для попарного сравнения непараметрических величин, *U*-критерий Манна–Уитни для сравнения непараметрических величин и непараметрический тест Спирмена для вычисления коэффициентов корреляции.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Длина теломер различна в компартментах бластоцист человека

Для оценки длины теломер в компартментах бластоцист человека применяли метод Q-FISH (quantitative fluorescence *in situ* hybridization) с теломерными ДНК-зондами (K532611–8, DAKO, Дания) на фиксированных интерфазных ядрах ТЭ и ВКМ (рис. 1). Метод Q-FISH широко применяется для оценки длины теломер в клетках, зафиксированных как на стадии метафазы [20, 27, 28], так и интерфазы [28]. Преимуществом данного подхода по сравнению с молекулярно-генетическими методами является возможность точной оценки длины теломер в индивидуальных клетках малоклеточных образцов.

При фиксации метафазных или интерфазных хромосом на предметном стекле степень конденсации хроматина может варьировать как между клетками, так и в пределах одной клетки между разными хромосомами. Чтобы нивелировать влияние степени конденсации хроматина на результаты измерений яркости и размера теломерного флуоресцентного сигнала, производили расчет относительной, а не абсолютной длины теломер. Для этого искали отношения интенсивности флуоресценции гибридизационных сигналов к теломерным участкам к гибридизационному сигналу реперного участка. В качестве репера был выбран район длинного плеча хромосомы 21 q22.13–q22.2 (LSI 21), который характеризуется низкой межиндивидуальной вариабельностью.

Измерение относительной длины теломер проводили в каждой бластоцисте: в 2–49 интерфазных ядрах ТЭ и 2–31 интерфазном ядре ВКМ. В каждом интерфазном

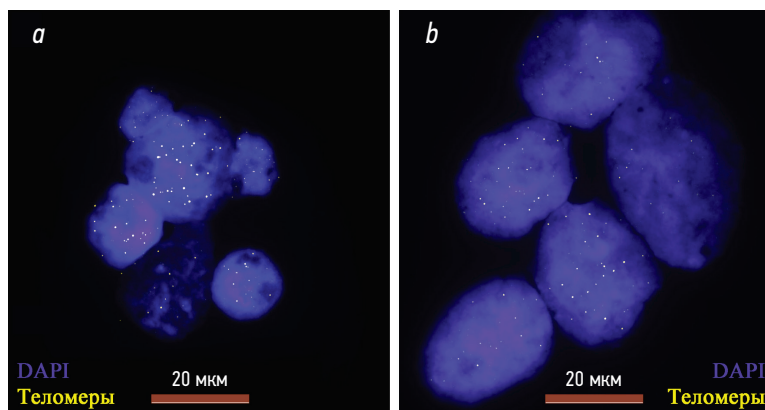


Рис. 1. Интерфазные ядра трофобласта (а) и внутренней клеточной массы (б) бластоцисты человека после выявления теломер методом Q-FISH с использованием теломерных ДНК-зондов (желтый) и окрашивания DAPI (синий)

Fig. 1. Interphase nuclei from trophoblast (a) and inner cell mass (b) of a human blastocyst after telomere detection by Q-FISH using telomeric DNA probes (yellow) and staining with DAPI (blue)

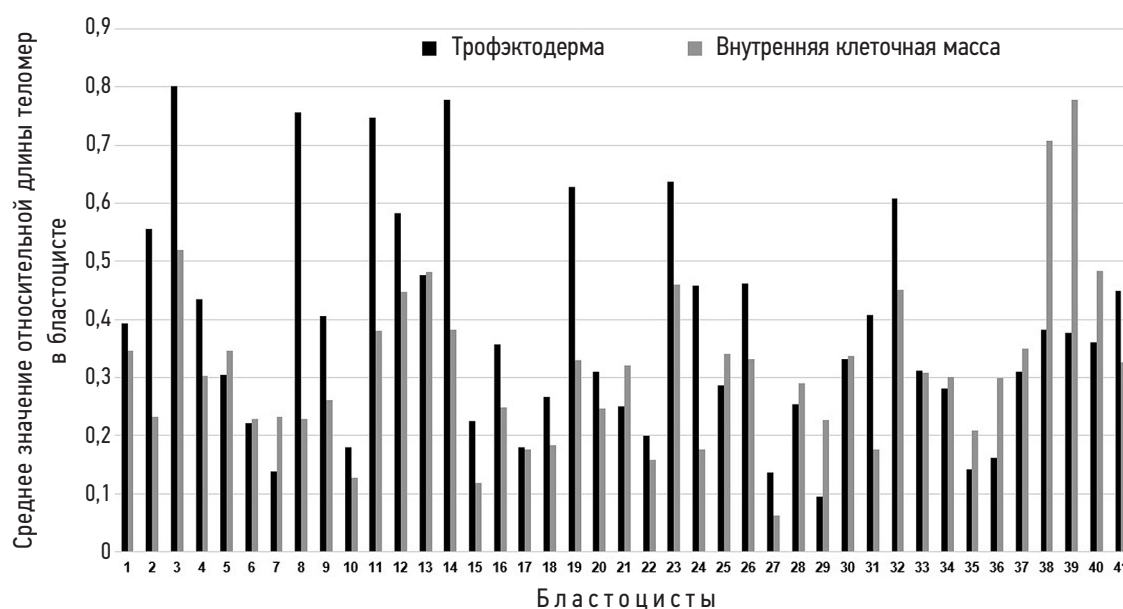


Рис. 2. Средние относительные длины теломер в трофэктодерме и внутренней клеточной массе 41 бластоцисты человека
Fig. 2. Mean relative telomere lengths in trophoblasts and inner cell mass of 41 human blastocysts

ядре с помощью программного обеспечения Image J 1.52n измеряли интенсивность флуоресценции 16 не прилегающих друг к другу гибридационных сигналов к теломерным участкам и находили среднее значение для ядра. В этом же интерфазном ядре измеряли интенсивность флуоресценции гибридационных сигналов реперных участков LSI 21 и также находили среднее. Вычисляли относительную длину теломер в каждом интерфазном ядре, находя отношение средней интенсивности флуоресценции теломерных районов к таковой реперных районов. Затем вычисляли усредненное значение относительной длины теломер для ТЭ и ВКМ в каждой бластоцисте. Таким образом, в результате вычисления относительной длины теломер в компартаментах 41 бластоцисты, отобранной для анализа, было получено 41 значение для ТЭ и 41 значение для ВКМ.

Обобщенный тест Д'Агостино–Пирсона показал нормальное распределение значений относительной длины теломер в ТЭ ($p = 0,1745$) и ненормальное в ВКМ ($p = 0,0011$), что обусловило выбор непараметрических критериев для сравнения этих выборок. В результате сравнительного анализа установлено, что относительная длина теломер в ТЭ достоверно выше таковой в ВКМ (7-критерий Вилкоксона, $p = 0,0256$; рис. 2).

Проведен анализ вариабельности длины теломер в ТЭ и ВКМ. Для каждой бластоцисты было рассчитано соотношение между относительной длиной теломер в ТЭ и таковой в ВКМ. В большинстве случаев (25 из 41) полученные значения ожидаемо превышали 1, а в 16 из 41 случая были меньше 1. В результате расчета коэффициента осцилляции, позволяющего оценить отклонение относительной длины теломер от среднего, установлены следующие значения: 185 % для ТЭ, 227 % для ВКМ и 220 % для ТЭ/ВКМ.

Таким образом, в бластоцистах человека теломеры длиннее в ТЭ, чем в ВКМ, при этом длина теломер в обоих компартаментах варьирует от бластоцисты к бластоцисте.

Длина теломер в ТЭ и ВКМ бластоцист человека не зависит от наличия патологии кариотипа

Для анализа возможного вклада патологии кариотипа в вариабельность длины теломер в ТЭ и ВКМ бластоцисты были разделены на две группы, в зависимости от наличия генетического дисбаланса, выявленного в рамках ПГТ и его верификации методом FISH в ядрах ТЭ и ВКМ: бластоцисты без генетического дисбаланса ($n = 15$) и бластоцисты с генетическим дисбалансом ($n = 26$). В результате сравнения относительной длины теломер в ТЭ бластоцист без генетического дисбаланса с таковой у бластоцист с генетическим дисбалансом различий выявлено не было ($p = 0,5931$, U -критерий Манна–Уитни). Относительная длина теломер также не различалась в ВКМ бластоцист с генетическим дисбалансом и без такового ($p = 0,6116$, U -критерий Манна–Уитни). Сравнение соотношений относительной длины теломер ТЭ/ВКМ между бластоцистами с генетическим дисбалансом и без такового так же не позволило выявить отличий ($p = 0,8094$, U -критерий Манна–Уитни).

Таким образом, наличие патологии кариотипа не ассоциировано с изменением длины теломер в компартаментах бластоцист человека.

Возраст пациенток не влияет на длину теломер в компартаментах бластоцист

Для оценки возможного влияния возраста матери на длину теломер в бластоцисте проведен сравнительный анализ длины теломер в ТЭ и ВКМ между двумя группами бластоцист: полученными от пациенток младшего

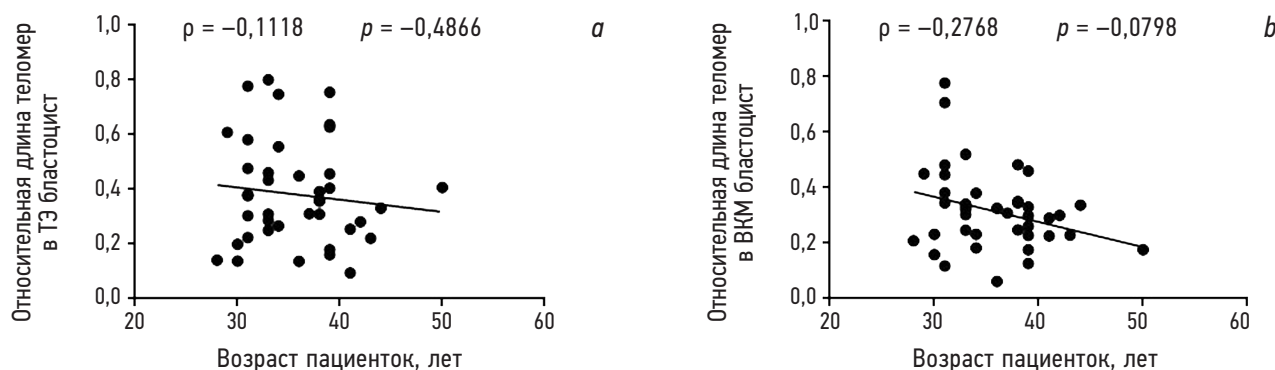


Рис. 3. Отсутствие взаимосвязи длины теломер в трофэктодерме (ТЭ) (а) и внутренней клеточной массе (ВКМ) (б) бластоцист человека с возрастом пациентки, от которой получены бластоцисты. Статистически значимая корреляция отсутствует (непараметрический тест Спирмена)

Fig. 3. The scatter plots of the mean relative telomere lengths in trophectoderm (ТЭ) (а) and in inner cell mass (ВКМ) (б) and maternal age. The Spearman test showed no significant correlations ($\rho = -0.1118$, $p = 0.4866$ for TE and $\rho = -0.2768$, $p = 0.0798$ for ICM)

(до 35 лет; $n = 20$) и старшего (35 лет и старше; $n = 21$) репродуктивного возраста. Не обнаружено различий между бластоцистами, полученными от пациенток младшего и старшего репродуктивного возраста, при сравнении с помощью U -критерий Манна–Уитни относительной длины теломер в ТЭ ($p = 0,3556$), в ВКМ ($p = 0,0974$) и соотношений ТЭ/ВКМ ($p = 0,7022$).

Проведено сравнение относительной длины теломер в компартаментах бластоцист с учетом наличия/отсутствия в них генетического дисбаланса и возраста пациенток, от которых получены бластоцисты. При отсутствии выявленного генетического дисбаланса относительная длина теломер не отличалась между бластоцистами, полученными от пациенток младшего ($n = 5$) и старшего ($n = 10$) репродуктивного возраста ($p > 0,9999$ для ТЭ, $p = 0,5122$ для ВКМ и $p = 0,4795$ для ТЭ/ВКМ, U -критерий Манна–Уитни). При наличии генетического дисбаланса различий в относительной длине теломер в бластоцистах, полученных от пациенток младше ($n = 15$) и старше 35 лет ($n = 11$) также выявлено не было ($p = 0,3763$ для ТЭ, $p = 0,2131$ для ВКМ и $p = 0,9806$ для ТЭ/ВКМ, U -критерий Манна–Уитни).

Корреляционный анализ не позволил установить достоверной взаимозависимости между возрастом пациенток, от которых получены бластоцисты и относительной длиной теломер в их ТЭ ($\rho = -0,1118$, $p = 0,4866$) и ВКМ ($\rho = -0,2768$, $p = 0,0798$; рис. 3).

Таким образом, длина теломер в компартаментах бластоцист с генетическим дисбалансом и без такового не взаимосвязана с возрастом пациенток, от которых они получены.

Длина теломер в ВКМ бластоцист человека ассоциирована с их качеством, оцененным по Гарднеру

Для проверки ассоциации длины теломер в компартаментах бластоцист с их качеством, определенным на основании оценки морфологии по Гарднеру, бластоцисты разделили на две группы: высокого и среднего качества.

В шкале Гарднера цифра от 1 до 6 описывает размер полости бластоцисты, при этом бластоцисты, в которых началось вскрытие блестящей оболочки, и бластоцисты, освобожденные от блестящей оболочки и готовые к имплантации, обозначают цифрами 5 и 6 соответственно. Первая буква в шкале Гарднера обозначает качество ВКМ, а вторая буква — качество ТЭ, где А — это наилучшее качество по количественному и качественному клеточному составу компартамента, а С — наихудшее, с дегенеративными процессами клеток [21]. В группу высокого качества вошли 11 бластоцист с оценкой 6АА и 5АА по шкале Гарднера, а в группу среднего качества — 30 остальных бластоцист — 5АВ, 5ВА и более низкого качества вплоть до 3ВВ и 2АА. Сравнение относительной длины теломер в ТЭ не позволило выявить различия между бластоцистами высокого и среднего качества ($p = 0,3075$, U -критерий Манна–Уитни). Однако в ВКМ теломеры оказались длиннее в бластоцистах среднего качества по сравнению с бластоцистами высокого качества ($p = 0,0101$, U -критерий Манна–Уитни; рис. 4).

Таким образом, длина теломер в ВКМ, но не в ТЭ, бластоцист ассоциирована с их качеством на основании оценки по Гарднеру: для бластоцист среднего качества характерны более длинные теломеры, чем для бластоцист высокого качества.

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на то что теломеры и механизмы регуляции их длины изучаются уже несколько десятков лет, многие вопросы, касающиеся запрограммированных и незапрограммированных изменений длины теломер в онтогенезе человека, остаются невыясненными. Прежде всего это касается самых ранних этапов развития — доимплантационного периода, когда материал для исследования особенно труднодоступен. Внедрение в медицинскую практику методов вспомогательной репродукции дало уникальную возможность изучения эмбрионов человека *in vitro*.

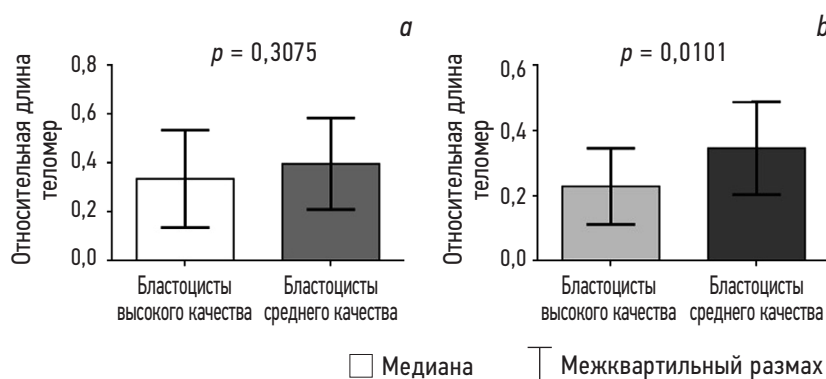


Рис. 4. Сравнение относительной длины теломер между бластоцистами высокого и среднего качества. Длина теломер не отличается в трофобласте (a), однако во внутренней клеточной массе (b) бластоцист среднего качества теломеры длиннее, чем у бластоцист высокого качества

Fig. 4. The comparisons of mean relative telomere lengths between blastocysts of high and medium quality. Telomere lengths do not differ between trophoblasts (a). Telomeres in inner cell mass (b) are longer in medium quality blastocysts compared to telomeres of high quality blastocysts

В настоящем исследовании мы сопоставили длину теломер в ТЗ и ВКМ бластоцист человека, а также оценили возможную связь с длиной теломер таких факторов, как качество бластоцист, наличие у них генетического дисбаланса и возраст пациенток, от которых получены бластоцисты.

Ключевой и новой находкой настоящего исследования является различная длина теломер в компартаментах бластоцист человека: в ТЗ теломеры оказались длиннее, чем в ВКМ. В исследованиях других авторов сравнение длины теломер в компартаментах бластоцист было проведено только на модельных объектах. При этом было показано, что в бластоцистах мышей теломеры длиннее в ВКМ, а в бластоцистах коров — наоборот, в ТЗ [29, 30]. Можно, таким образом, заключить, что длина теломер в компартаментах бластоцист является видоспецифичным признаком.

Факт того, что в ТЗ бластоцист человека теломеры длиннее, чем в ВКМ, представляет безусловный интерес в связи со значением трофобласта для имплантации. На этой стадии, когда собственно эмбрион только начинает формироваться, ключевую роль играет именно трофобласт, впоследствии образующий экстраэмбриональные ткани зародыша, обеспечивающие множество функций, необходимых для внутриутробного развития. Для экстраэмбриональных тканей характерен очень быстрый рост: митотический индекс цитотрофобласта хориона сопоставим с таковым некоторых типов раковых опухолей [31]. При этом «продолжительность жизни» экстраэмбриональных тканей невелика и ограничена периодом внутриутробного развития организма. Вероятно, биологическое значение длинных теломер в ТЗ бластоцист человека связано именно с интенсивными клеточными делениями, обеспечивающими быстрый рост экстраэмбриональных тканей. «Запас» длины теломер, сформированный при делениях дробления за счет альтернативного механизма удлинения теломер (ALT, alternative mechanism of telomere lengthening) [32] и теломеразной активности [33],

снижает потребность клеток трофобластного происхождения в активной работе механизмов удлинения теломер на протяжении всего периода жизни экстраэмбриональных тканей. Действительно, прямых доказательств активности в экстраэмбриональных тканях механизма ALT получено не было [34]. Еще одним косвенным подтверждением является физиологическое снижение активности теломеразы в плаценте по мере прогрессирования беременности [35–37] и ее аномальное повышение при трофобластических болезнях [36, 38].

Среди факторов, взаимосвязанных с длиной теломер в эмбриогенезе, выделяют возраст матери и аномалии кариотипа эмбрионов. Работы по изучению взаимосвязи кариотипа с длиной теломер у доимплантационных эмбрионов человека остаются немногочисленными и в большей степени ориентированы на развитие прикладных возможностей. Необходимо также отметить противоречивость их результатов. Так, показано, что ооциты с короткими теломерами в большей степени подвержены ошибкам мейоза, влекущим возникновение анеуплоидий, в связи с чем авторами предложено рассматривать длину теломер в ооцитах в качестве критерия их селекции для достижения большей эффективности ЭКО [39]. При этом авторы отметили меньшую длину теломер у эмбрионов с анеуплоидиями только на стадии делений дробления, но не на стадии бластоцисты [39]. Установлено, что у мозаичных эмбрионов 4-го дня с задержкой развития теломеры в анеуплоидных клетках короче, чем в эуплоидных [40]. В недавнем исследовании, напротив, показано, что у анеуплоидных бластоцист теломеры длиннее, чем у эуплоидных [41]. Согласно нашим результатам, длина теломер одинакова при сравнении как ТЗ, так и ВКМ бластоцист с генетическим дисбалансом и без такового. При этом следует отметить, что в нашем исследовании анализ длины теломер проведен с применением по-клеточного анализа с учетом разделения бластоцисты на компартменты, что несколько отличает наш методический подход от работ других авторов. Наши данные

согласуются с исследованием, основанным на поклеточном анализе полярных телец ооцитов и бластомеров дробящихся эмбрионов 3-го дня развития, убедительно показавшем отсутствие взаимосвязи длины теломер с наличием анеуплоидии [42]. Однако, принимая во внимание противоречивость полученных к настоящему моменту сведений о взаимосвязи длины теломер с наличием аномалий кариотипа в бластоцистах человека, можно говорить, что этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Не до конца понятным также остается, в какой степени возраст матери влияет на длину теломер у эмбрионов. Тенденция к укорочению теломер ранее была выявлена у эмбрионов от женщин старшего репродуктивного возраста и женщин с привычным невынашиванием в анамнезе, однако связи длины теломер со способностью эмбрионов к развитию до 5-го дня установлено не было [40]. При анализе триплоидных зигот человека не было выявлено корреляции длины теломер в пронуклеусах с возрастом родителей [20]. Отсутствие взаимосвязи длины теломер с возрастом женщины продемонстрировано в исследовании, проведенном на полярных тельцах ооцитов и бластомерах эмбрионов 3-го дня развития [42], что согласуется с полученными нами результатами для ТЭ и ВКМ бластоцист человека. Однако следует отметить, что несмотря на отсутствие статистически значимой корреляции между длиной теломер в компартментах бластоцист и возрастом пациенток, от которых они получены, мы наблюдали тенденцию к укорочению теломер в бластоцистах с увеличением возраста женщин, более выраженную для ВКМ.

Очевидно, что большинство доступных в литературе исследований взаимосвязи материнского возраста и анеуплоидий с длиной теломер у доимплантационных эмбрионов человека так или иначе связаны с теломерной теорией репродуктивного старения (*telomere theory of reproductive ageing*) [43, 44]. Однако, учитывая накапливающиеся данные, не поддерживающие эту концепцию, можно предполагать несколько иную биологическую роль теломер. Вероятно, длина теломер может выступать не только как возможная причина возникновения анеуплоидий, особенно в старшем женском репродуктивном возрасте, но и как один из модификаторов эффекта аномалий кариотипа и других негативных факторов. Иными словами, если эмбрион унаследовал более длинные теломеры, то он, даже при наличии генетического дисбаланса, имеет преимущество в прохождении критических периодов развития по сравнению с эмбрионом с более короткими теломерами. При этом, по всей видимости, важным этапом негативной селекции эмбрионов является имплантация, которую способны успешно пройти бластоцисты с определенными сочетаниями характеристик длины теломер, кариотипа и морфологии. Наследование эмбрионом определенной длины теломер, в свою очередь, преддетерминировано как длиной теломер в гаметах

родителей, так и экзо- и эндогенными воздействиями в периконцепционный период. Не исключен при этом и трансгенерационный эффект [45].

В пользу нашего предположения о том, что длина теломер может выступать в качестве модификатора негативных эффектов с критическим этапом негативного отбора на стадии имплантации, свидетельствует несколько фактов. Во-первых, в настоящем исследовании и в работах других авторов отмечена высокая гетерогенность длины теломер у дробящихся эмбрионов [39, 40, 42, 46]. Во-вторых, согласно нашим данным, в ВКМ бластоцист более низкого качества теломеры длиннее, чем у бластоцист высокого качества. Это дает основание предполагать, что эмбрионы с более длинными теломерами способны формировать бластоцисту, несмотря на снижение количественных и качественных клеточных характеристик. Наконец, в нашей предшествующей работе, проведенной на клетках цитотрофобласта хориона в первом триместре, у развивающихся плодов с аномальным кариотипом выявлены более длинные теломеры по сравнению с плодами с аномальным кариотипом, остановившимися в развитии, и по сравнению с развивающимися плодами с нормальным кариотипом [47]. Эти результаты позволили нам заключить, что наследование длинных теломер может способствовать развитию эмбриона с аномальным кариотипом, а сочетание коротких теломер и хромосомной патологии, даже совместимой с жизнью, приводит к раннему выкидышу. Эти предположения согласуются с исследованиями, выявившими короткие теломеры у анеуплоидных остановившихся в развитии эмбрионов [48] и более длинные теломеры у новорожденных с трисомией 21 по сравнению с новорожденными, имеющими нормальный кариотип [49, 50]. Кроме того, активация теломеразы и следующее за ней удлинение теломер как способ адаптации к различным стрессовым воздействиям хорошо известен в постнатальный период [51, 52]. Это также косвенно свидетельствует в пользу возможной роли длины теломер в качестве модификатора негативных факторов в эмбриогенезе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в клетках ТЭ бластоцист человека теломеры длиннее, чем в ВКМ, что, по всей видимости, связано с ролью трофобласта в имплантации и дальнейшем быстром формировании экстраэмбриональных структур. Высокая межиндивидуальная вариабельность длины теломер, отсутствие ее взаимосвязи с наличием генетического дисбаланса в бластоцистах и с возрастом пациенток, от которых получены бластоцисты, а также более длинные теломеры в ВКМ бластоцист среднего качества по сравнению с бластоцистами высокого качества свидетельствуют о том, что длина теломер может выступать как один из модификаторов эффекта аномалий кариотипа и других негативных факторов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией. Личный вклад каждого автора: А.В. Тихонов — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материалов, микроскопический анализ, анализ полученных данных, оформление изображений, написание текста; О.А. Ефимова — концепция и дизайн исследования, написание текста; М.И. Крапивин — сбор и обработка материалов, постановка Q-FISH, микроскопический анализ, оформление изображений; О.В. Малышева — сбор и обработка материалов, проведение исследования методом aCGH; Е.М. Комарова — сбор и обработка материалов; А.В. Голубева — сбор и обработка материалов, постановка FISH; А.А. Пендина — концепция и дизайн исследования, анализ полученных данных, написание текста, внесение окончательной правки.

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-75-00125, <https://rscf.ru/project/22-75-00125/>).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Этический комитет. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта» (протокол № 120 от 21.07.2022).

Информированное согласие на публикацию. Авторы получили письменное согласие пациентов на публикацию медицинских данных.

ADDITIONAL INFO

Authors' contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the study, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the article, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the study. Personal contribution of each author: A.V. Tikhonov — experimental design, collecting and preparation of samples, microscopic analysis, data analysis, imagine design, writing the main part of the text; O.A. Efimova — experimental design, writing the main part of the text; M.I. Krapivin — collecting and preparation of samples, Q-FISH, microscopic analysis, imagine design; O.V. Malysheva — collecting and preparation of samples, aCGH; E.M. Komarova — collecting and preparation of samples; A.V. Golubeva — collecting and preparation of samples, FISH; A.A. Pendina — experimental design, data analysis, writing the main part of the text, making final edits.

Funding source. The study was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 22-75-00125, <https://rscf.ru/project/22-75-00125/>).

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Ethics approval. The protocol of the study was approved by the local Ethics Committee of the D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology (No. 120 of 21.07.2022).

Consent for publication. Written consent was obtained from the patient for publication of relevant medical information within the manuscript.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schoeftner S., Blasco M.A. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II // *Nat Cell Biol.* 2008. Vol. 10, N 2. P. 228–236. doi: 10.1038/ncb1685
2. Schmutz I., de Lange T. Shelterin // *Curr Biol.* 2016. Vol. 26, N 10. P. R397–R399. doi: 10.1016/j.cub.2016.01.056
3. Smith E.M., Pendlebury D.F., Nandakumar J. Structural biology of telomeres and telomerase // *Cell Mol Life Sci.* 2020. Vol. 77, N 1. P. 61–79. doi: 10.1007/s00018-019-03369-x
4. Olovnikov A.M. A theory of marginotomy: the incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon // *J Theor Biol.* 1973. Vol. 41, N 1. P. 181–190. doi: 10.1016/0022-5193(73)90198-7
5. Barnes R.P., Fouquerel E., Oprea P.L. The impact of oxidative DNA damage and stress on telomere homeostasis // *Mech Ageing Dev.* 2019. Vol. 177. P. 37–45. doi: 10.1016/j.mad.2018.03.013
6. Lustig A., Shterev I., Geyer S., et al. Long term effects of radiation exposure on telomere lengths of leukocytes and its associated biomarkers among atomic-bomb survivors // *Oncotarget.* 2016. Vol. 7, N 26. P. 38988–38998. doi: 10.18632/oncotarget.8801
7. de Souza M.R., Kahl V.F.S., Rohr P., et al. Shorter telomere length and DNA hypermethylation in peripheral blood cells of coal workers // *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2018. Vol. 836 (Part B). P. 36–41. doi: 10.1016/j.mrgentox.2018.03.009
8. Cesare A.J., Hayashi M.T., Crabbe L., Karlseder J. The telomere deprotection response is functionally distinct from the genomic DNA damage response // *Mol Cell.* 2013. Vol. 51, N 2. P. 141–155. doi: 10.1016/j.molcel.2013.06.006
9. Cohen S.B., Graham M.E., Lovrecz G.O., et al. Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells // *Science.* 2007. Vol. 315, N 5820. P. 1850–1853. doi: 10.1126/science.1138596
10. Dunham M.A., Neumann A.A., Fasching C.L., Reddel R.R. Telomere maintenance by recombination in human cells // *Nat Genet.* 2000. Vol. 26, N 4. P. 447–450. doi: 10.1038/82586
11. Heidinger B.J., Blount J.D., Boner W., et al. Telomere length in early life predicts lifespan // *PNAS USA.* 2012. Vol. 109, N 5. P. 1743–1748. doi: 10.1073/pnas.1113306109
12. Ye Q., Apsley A.T., Etzel L., et al. Telomere length and chronological age across the human lifespan: A systematic review and meta-analysis of 414 study samples including 743,019 individuals // *Ageing Res Rev.* 2023. Vol. 90. ID102031. doi: 10.1016/j.arr.2023.102031
13. Bau D.-T., Lippman S.M., Xu E., et al. Short telomere lengths in peripheral blood leukocytes are associated with an in-

creased risk of oral premalignant lesion and oral squamous cell carcinoma // *Cancer*. 2013. Vol. 119, N 24. P. 4277–4283. doi: 10.1002/cncr.28367

14. Jang J.S., Choi Y.Y., Lee W.K., et al. Telomere length and the risk of lung cancer // *Cancer Sci*. 2008. Vol. 99, N 7. P. 1385–1389. doi: 10.1111/j.1349-7006.2008.00831.x

15. Qin Q., Sun J., Yin J., et al. Telomere length in peripheral blood leukocytes is associated with risk of colorectal cancer in Chinese population // *PLoS One*. 2014. Vol. 9, N 2. ID e88135. doi: 10.1371/journal.pone.0088135

16. Berneau S.C., Shackleton J., Nevin C., et al. Associations of sperm telomere length with semen parameters, clinical outcomes and lifestyle factors in human normozoospermic samples // *Andrology*. 2020. Vol. 8, N 3. P. 583–593. doi: 10.1111/andr.12734

17. Hanson B.M., Tao X., Zhan Y., et al. Shorter telomere length of white blood cells is associated with higher rates of aneuploidy among infertile women undergoing *in vitro* fertilization // *Fertil Steril*. 2021. Vol. 115, N 4. P. 957–965. doi: 10.1016/j.fertnstert.2020.09.164

18. Шиленкова Ю.В., Пендина А.А., Федорова Е.М., и др. Особенности реализации репродуктивной функции у носителей транслокаций хромосом // *Журнал акушерства и женских болезней*. 2022. Т. 71, № 5. С. 85–96. EDN: YOTDWW doi: 10.17816/JOWD109329

19. ESHRE Guideline Group on Good Practice in IVF Labs, De los Santos M.J., Apter S., et al. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories (2015) // *Hum Reprod*. 2016. Vol. 31, N 4. P. 685–686. doi: 10.1093/humrep/dew016

20. Pendina A.A., Krapivin M.I., Efimova O.A., et al. Telomere length in metaphase chromosomes of human triploid zygotes // *Int J Mol Sci*. 2021. Vol. 22, N 11. ID 5579. doi: 10.3390/ijms22115579

21. Gardner D.K., Schoolcraft W.B. *In vitro* culture of human blastocysts. В кн.: Towards reproductive certainty: Fertility and genetics beyond / R. Jansen, D. Mortimer, editors. Camforth, UK: Parthenon Publishing, 1999. P. 378–388.

22. Pendina A.A., Efimova O.A., Fedorova I.D., et al. DNA methylation patterns of metaphase chromosomes in human preimplantation embryos // *Cytogenet Genome Res*. 2011. Vol. 132, N 1–2. P. 1–7. doi: 10.1159/000318673

23. Efimova O.A., Pendina A.A., Tikhonov A.V., et al. Chromosome hydroxymethylation patterns in human zygotes and cleavage-stage embryos // *Reproduction*. 2015. Vol. 149, N 3. P. 223–33. doi: 10.1530/REP-14-0343

24. Tikhonov A.V., Krapivin M.I., Malysheva O.V., et al. Re-Examination of PGT-A detected genetic pathology in compartments of human blastocysts: A series of 23 cases // *J Clin Med*. 2024. Vol. 13, N 11. ID 3289. doi: 10.3390/jcm13113289

25. Efimova O.A., Pendina A.A., Tikhonov A.V., et al. Genome-wide 5-hydroxymethylcytosine patterns in human spermatogenesis are associated with semen quality // *Oncotarget*. 2017. Vol. 8, N 51. P. 88294–88307. doi: 10.18632/oncotarget.18331

26. Liehr T., Weise A. Background. В кн.: Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) / T. Liehr, editor. Springer, Berlin, Heidelberg, 2017. P. 337–346. doi: 10.1007/978-3-662-52959-1_1

27. Canela A., Vera E., Klatt P., Blasco M.A. High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies // *PNAS USA*. 2007. Vol. 104, N 13. P. 5300–5305. doi: 10.1073/pnas.0609367104

28. Ourliac-Garnier I., Londoño-Vallejo A. Telomere length analysis by quantitative fluorescent *in situ* hybridization (Q-FISH). В кн.: Telomeres and telomerase. Methods in molecular biology. Vol. 1587 / Z. Songyang, editor. New York: Humana Press, 2017. P. 29–39. doi: 10.1007/978-1-4939-6892-3_3

29. Iqbal K., Kues W.A., Baulain U., et al. Species-specific telomere length differences between blastocyst cell compartments and ectopic telomere extension in early bovine embryos by human telomerase reverse transcriptase // *Biol Reprod*. 2011. Vol. 84, N 4. P. 723–733. doi: 10.1095/biolreprod.110.087205

30. Varela E., Schneider R.P., Ortega S., Blasco M.A. Different telomere-length dynamics at the inner cell mass versus established embryonic stem (ES) cells // *PNAS USA*. 2011. Vol. 108, N 37. P. 15207–15212. doi: 10.1073/pnas.1105414108

31. Kar M., Ghosh D., Sengupta J. Histochemical and morphological examination of proliferation and apoptosis in human first trimester villous trophoblast // *Hum Reprod*. 2007. Vol. 22, N 11. P. 2814–2823. doi: 10.1093/humrep/dem284

32. Liu L., Bailey S., Okuka M., et al. Telomere lengthening early in development // *Nat Cell Biol*. 2007. Vol. 9. P. 1436–1441. doi: 10.1038/ncb1664

33. Wright D.L., Jones E.L., Mayer J.F., et al. Characterization of telomerase activity in the human oocyte and preimplantation embryo // *Mol Hum Reprod*. 2001. Vol. 7, N 10. P. 947–955. doi: 10.1093/molehr/7.10.947

34. Poletti J., da Silva M.G. Telomere-Related disorders in fetal membranes associated with birth and adverse pregnancy outcomes // *Front Physiol*. 2020. Vol. 11. ID 561771. doi: 10.3389/fphys.2020.561771

35. Kyo S., Takakura M., Tanaka M., et al. Expression of telomerase activity in human chorion // *Biochem Biophys Res Commun*. 1997. Vol. 241, N 2. P. 498–503. doi: 10.1006/bbrc.1997.7767

36. Chen R.J., Chu C.T., Huang S.C., et al. Telomerase activity in gestational trophoblastic disease and placental tissue from early and late human pregnancies // *Hum Reprod*. 2002. Vol. 17, N 2. P. 463–468. doi: 10.1093/humrep/17.2.463

37. Colatto B.N., de Souza I.F., Schinke L.A.A., et al. Telomere length and telomerase activity in foetal membranes from term and spontaneous preterm births // *Reprod Sci*. 2020. Vol. 27, N 1. P. 411–417. doi: 10.1007/s43032-019-00054-z

38. Nishi H., Yahata N., Ohyashiki K., et al. Comparison of telomerase activity in normal chorionic villi to trophoblastic diseases // *Int J Oncol*. 1998. Vol. 12, N 1. P. 81–85. doi: 10.3892/ijo.12.1.81

39. Treff N.R., Su J., Taylor D., Scott R.T. Jr. Telomere DNA deficiency is associated with development of human embryonic aneuploidy // *PLoS Genet*. 2011. Vol. 7, N 6. ID e1002161. doi: 10.1371/journal.pgen.1002161

40. Mania A., Mantzouratou A., Delhanty J.D.A., et al. Telomere length in human blastocysts // *Reprod Biomed Online*. 2014. Vol. 28, N 5. P. 624–637. doi: 10.1016/j.rbmo.2013.12.010

41. Wang F., McCulloh D.H., Chan K., et al. The landscape of telomere length and telomerase in human embryos at blastocyst stage // *Genes (Basel)*. 2023. Vol. 14, N 6. ID 1200. doi: 10.3390/genes14061200

42. Turner K., Lynch C., Rouse H., et al. Direct single-cell analysis of human polar bodies and cleavage-stage embryos reveals no evidence of the telomere theory of reproductive ageing in relation to aneuploidy generation // *Cells*. 2019. Vol. 8, N 2. ID 163. doi: 10.3390/cells8020163

43. Keefe D.L. Telomeres and genomic instability during early development // *Eur J Med Genet.* 2020. Vol. 63, N 2. ID 103638. doi: 10.1016/j.ejmg.2019.03.002

44. Anifandis G., Samara M., Simopoulou M., et al. Insights into the role of telomeres in human embryological parameters. Opinions regarding IVF // *J Dev Biol.* 2021. Vol. 9, N 4. ID 49. doi: 10.3390/jdb9040049

45. Epel E.S. Can childhood adversity affect telomeres of the next generation? Possible mechanisms, implications, and next-generation research // *Am J Psychiatry.* 2020. Vol. 177, N 1. P. 7–9. doi: 10.1176/appi.ajp.2019.19111161

46. Turner S., Wong H.P., Rai J., Hartshorne G.M. Telomere lengths in human oocytes, cleavage stage embryos and blastocysts // *Mol Hum Reprod.* 2010. Vol. 16, N 9. P. 685–694. doi: 10.1093/molehr/gaq048

47. Krapivin M.I., Tikhonov A.V., Efimova O.A., et al. Telomere length in chromosomally normal and abnormal miscarriages and ongoing pregnancies and its association with 5-hydroxymethylcytosine patterns // *Int J Mol Sci.* 2021. Vol. 22, N 12. ID 6622. doi: 10.3390/ijms22126622

48. Huleyuk N., Tkach I., Zastavna D., Tyrka M. Can telomere shortening be the main indicator of non-viable fetus elimination? // *Mol Cytogenet.* 2018. Vol. 11. ID 11. doi: 10.1186/s13039-018-0361-9

49. Vaziri H., Schächter F., Uchida I., et al. Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes // *Am J Hum Genet.* 1993. Vol. 52, N 4. P. 661–667.

50. Bhaumik P., Bhattacharya M., Ghosh P., et al. Telomere length analysis in Down syndrome birth // *Mech Ageing Dev.* 2017. Vol. 164. P. 20–26. doi: 10.1016/j.mad.2017.03.006

51. Spivak I., Tkachuk N., Zhekalov A., Dolinina T. Role of genotype in maintaining telomere length at prolonged psychological stress. В кн.: Professional culture of the specialist of the future, vol. 51. European proceedings of social and behavioural sciences / V. Chernyavskaya, H. Kuße, editors. Future Academy, 2018. P. 515–527. doi: 10.15405/epsbs.2018.12.02.56

52. Garrett-Bakelman F.E., Darshi M., Green S.J., et al. The NASA Twins Study: A multidimensional analysis of a year-long human spaceflight // *Science.* 2019. Vol. 364, N 6436. ID eaau8650. doi: 10.1126/science.aau8650

REFERENCES

- Schoeftner S, Blasco MA. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat Cell Biol.* 2008;10(2):228–236. doi: 10.1038/ncb1685
- Schmutz I, de Lange T. Shelterin. *Curr Biol.* 2016;26(10):R397–R399. doi: 10.1016/j.cub.2016.01.056
- Smith EM, Pendlebury DF, Nandakumar J. Structural biology of telomeres and telomerase. *Cell Mol Life Sci.* 2020;77(1):61–79. doi: 10.1007/s00018-019-03369-x
- Olovnikov AM. A theory of marginotomy: the incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol.* 1973;41(1):181–190. doi: 10.1016/0022-5193(73)90198-7
- Barnes RP, Fouquerel E, Opresko PL. The impact of oxidative DNA damage and stress on telomere homeostasis. *Mech Ageing Dev.* 2019;177:37–45. doi: 10.1016/j.mad.2018.03.013
- Lustig A, Shterev I, Geyer S, et al. Long term effects of radiation exposure on telomere lengths of leukocytes and its associated biomarkers among atomic-bomb survivors. *Oncotarget.* 2016;7(26):38988–38998. doi: 10.18632/oncotarget.8801
- de Souza MR, Kahl VFS, Rohr P, et al. Shorter telomere length and DNA hypermethylation in peripheral blood cells of coal workers. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2018;836(B):36–41. doi: 10.1016/j.mrgentox.2018.03.009
- Cesare AJ, Hayashi MT, Crabbe L, Karlseder J. The telomere deprotection response is functionally distinct from the genomic DNA damage response. *Mol Cell.* 2013;51(2):141–155. doi: 10.1016/j.molcel.2013.06.006
- Cohen SB, Graham ME, Lovrecz GO, et al. Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science.* 2007;315(5820):1850–1853. doi: 10.1126/science.1138596
- Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL, Reddel RR. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet.* 2000;26(4):447–450. doi: 10.1038/82586
- Heidinger BJ, Blount JD, Boner W, et al. Telomere length in early life predicts lifespan. *PNAS USA.* 2012;109(5):1743–1748. doi: 10.1073/pnas.1113306109
- Ye Q, Apsley AT, Etzel L, et al. Telomere length and chronological age across the human lifespan: A systematic review and meta-analysis of 414 study samples including 743,019 individuals. *Ageing Res Rev.* 2023;90:102031. doi: 10.1016/j.arr.2023.102031
- Bau D-T, Lippman SM, Xu E, et al. Short telomere lengths in peripheral blood leukocytes are associated with an increased risk of oral premalignant lesion and oral squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2013;119(24):4277–4283. doi: 10.1002/cncr.28367
- Jang JS, Choi YY, Lee WK, et al. Telomere length and the risk of lung cancer. *Cancer Sci.* 2008;99(7):1385–1389. doi: 10.1111/j.1349-7006.2008.00831.x
- Qin Q, Sun J, Yin J, et al. Telomere length in peripheral blood leukocytes is associated with risk of colorectal cancer in Chinese population. *PLoS One.* 2014;9(2):e88135. doi: 10.1371/journal.pone.0088135
- Berneau SC, Shackleton J, Nevin C, et al. Associations of sperm telomere length with semen parameters, clinical outcomes and lifestyle factors in human normozoospermic samples. *Andrology.* 2020;8(3):583–593. doi: 10.1111/andr.12734
- Hanson BM, Tao X, Zhan Y, et al. Shorter telomere length of white blood cells is associated with higher rates of aneuploidy among infertile women undergoing *in vitro* fertilization. *Fertil Steril.* 2021;115(4):957–965. doi: 10.1016/j.fertnstert.2020.09.164
- Shilenkova YV, Pendina AA, Fedorova EM, et al. Issues in reproductive health in chromosome translocation carriers. *Journal of obstetrics and women's diseases.* 2022;71(5):85–96. EDN: YOTDWW doi: 10.17816/JOWD109329
- ESHRE Guideline Group on Good Practice in IVF Labs, De los Santos MJ, Apter S, et al. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories (2015). *Hum Reprod.* 2016;31(4):685–686. doi: 10.1093/humrep/dew016
- Pendina AA, Krapivin M.I., Efimova OA, et al. Telomere length in metaphase chromosomes of human triploid zygotes. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11):5579. doi: 10.3390/ijms22115579
- Gardner DK, Schoolcraft WB. *In vitro* culture of human blastocysts. In: Jansen R, Mortimer D, editors. *Towards reproductive*

certainty: Fertility and genetics beyond. Camforth, UK: Parthenon Publishing; 1999. P. 378–388.

22. Pendina AA, Efimova OA, Fedorova ID, et al. DNA methylation patterns of metaphase chromosomes in human preimplantation embryos. *Cytogenet Genome Res*. 2011;132(1–2):1–7. doi: 10.1159/000318673

23. Efimova OA, Pendina AA, Tikhonov AV, et al. Chromosome hydroxymethylation patterns in human zygotes and cleavage-stage embryos. *Reproduction*. 2015;149(3):223–33. doi: 10.1530/REP-14-0343

24. Tikhonov AV, Krapivin MI, Malysheva OV, et al. Re-Examination of PGT-A detected genetic pathology in compartments of human blastocysts: A series of 23 cases. *J Clin Med*. 2024;13(11):3289. doi: 10.3390/jcm13113289

25. Efimova OA, Pendina AA, Tikhonov AV, et al. Genome-wide 5-hydroxymethylcytosine patterns in human spermatogenesis are associated with semen quality. *Oncotarget*. 2017;8(51):88294–88307. doi: 10.18632/oncotarget.18331

26. Liehr T, Weise A. Background. In: Liehr T, editor. *Fluorescence in situ hybridization (FISH)*. Springer, Berlin, Heidelberg; 2017. P. 337–346. doi: 10.1007/978-3-662-52959-1_1

27. Canela A, Vera E, Klatt P, Blasco MA. High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies. *PNAS USA*. 2007;104(13):5300–5305. doi: 10.1073/pnas.0609367104

28. Ourliac-Garnier I, Londoño-Vallejo A. Telomere length analysis by quantitative fluorescent in situ hybridization (Q-FISH). In: Songyang Z, editor. *Telomeres and telomerase. Methods in molecular biology*. Vol. 1587. New York: Humana Press; 2017. P. 29–39. doi: 10.1007/978-1-4939-6892-3_3

29. Iqbal K, Kues WA, Baulain U, et al. Species-specific telomere length differences between blastocyst cell compartments and ectopic telomere extension in early bovine embryos by human telomerase reverse transcriptase. *Biol Reprod*. 2011;84(4):723–733. doi: 10.1095/biolreprod.110.087205

30. Varela E, Schneider RP, Ortega S, Blasco MA. Different telomere-length dynamics at the inner cell mass versus established embryonic stem (ES) cells. *PNAS USA*. 2011;108(37):15207–15212. doi: 10.1073/pnas.1105414108

31. Kar M, Ghosh D, Sengupta J. Histochemical and morphological examination of proliferation and apoptosis in human first trimester villous trophoblast. *Hum Reprod*. 2007;22(11):2814–2823. doi: 10.1093/humrep/dem284

32. Liu L, Bailey S, Okuka M, et al. Telomere lengthening early in development. *Nat Cell Biol*. 2007;9:1436–1441. doi: 10.1038/ncb1664

33. Wright DL, Jones EL, Mayer JF, et al. Characterization of telomerase activity in the human oocyte and preimplantation embryo. *Mol Hum Reprod*. 2001;7(10):947–955. doi: 10.1093/molehr/7.10.947

34. Poletti J, da Silva MG. Telomere-Related disorders in fetal membranes associated with birth and adverse pregnancy outcomes. *Front Physiol*. 2020;11:561771. doi: 10.3389/fphys.2020.561771

35. Kyo S, Takakura M, Tanaka M, et al. Expression of telomerase activity in human chorion. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;241(2):498–503. doi:10.1006/bbrc.1997.7767

36. Chen RJ, Chu CT, Huang SC, et al. Telomerase activity in gestational trophoblastic disease and placental tissue from early and late human pregnancies. *Hum Reprod*. 2002;17(2):463–468. doi: 10.1093/humrep/17.2.463

37. Colatto BN, de Souza IF, Schinke LAA, et al. Telomere length and telomerase activity in foetal membranes from term and spontaneous preterm births. *Reprod Sci*. 2020;27(1):411–417. doi: 10.1007/s43032-019-00054-z

38. Nishi H, Yahata N, Ohyashiki K, et al. Comparison of telomerase activity in normal chorionic villi to trophoblastic diseases. *Int J Oncol*. 1998;12(1):81–85. doi: 10.3892/ijo.12.1.81

39. Treff NR, Su J, Taylor D, Scott RT Jr. Telomere DNA deficiency is associated with development of human embryonic aneuploidy. *PLoS Genet*. 2011;7(6):e1002161. doi: 10.1371/journal.pgen.1002161

40. Mania A, Mantzouratou A, Delhanty JDA, et al. Telomere length in human blastocysts. *Reprod Biomed Online*. 2014;28(5):624–637. doi: 10.1016/j.rbmo.2013.12.010

41. Wang F, McCulloh DH, Chan K, et al. The landscape of telomere length and telomerase in human embryos at blastocyst stage. *Genes (Basel)*. 2023;14(6):1200. doi: 10.3390/genes14061200

42. Turner K, Lynch C, Rouse H, et al. Direct single-cell analysis of human polar bodies and cleavage-stage embryos reveals no evidence of the telomere theory of reproductive ageing in relation to aneuploidy generation. *Cells*. 2019;8(2):163. doi: 10.3390/cells8020163

43. Keefe DL. Telomeres and genomic instability during early development. *Eur J Med Genet*. 2020;63(2):103638. doi: 10.1016/j.ejmg.2019.03.002

44. Anifandis G, Samara M, Simopoulou M, et al. Insights into the role of telomeres in human embryological parameters. Opinions regarding IVF. *J Dev Biol*. 2021;9(4):49. doi: 10.3390/jdb9040049

45. Epel ES. Can childhood adversity affect telomeres of the next generation? Possible mechanisms, implications, and next-generation research. *Am J Psychiatry*. 2020;177(1):7–9. doi: 10.1176/appi.ajp.2019.19111161

46. Turner S, Wong HP, Rai J, Hartshorne GM. Telomere lengths in human oocytes, cleavage stage embryos and blastocysts. *Mol Hum Reprod*. 2010;16(9):685–694. doi: 10.1093/molehr/gaq048

47. Krapivin MI, Tikhonov AV, Efimova OA, et al. Telomere length in chromosomally normal and abnormal miscarriages and ongoing pregnancies and its association with 5-hydroxymethylcytosine patterns. *Int J Mol Sci*. 2021;22(12):6622. doi: 10.3390/ijms22126622

48. Huleyuk N, Tkach I, Zastavna D, Tyrka M. Can telomere shortening be the main indicator of non-viable fetus elimination? *Mol Cytogenet*. 2018;11:11. doi: 10.1186/s13039-018-0361-9

49. Vaziri H, Schächter F, Uchida I, et al. Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am J Hum Genet*. 1993;52(4):661–667.

50. Bhaumik P, Bhattacharya M, Ghosh P, et al. Telomere length analysis in Down syndrome birth. *Mech Ageing Dev*. 2017;164:20–26. doi: 10.1016/j.mad.2017.03.006

51. Spivak I, Tkachuk N, Zhekalov A, Dolinina T. Role of genotype in maintaining telomere length at prolonged psychological stress. In: Chernyavskaya V, Kuße H, editors. *Professional culture of the specialist of the future, vol. 51. European proceedings of social and behavioural sciences*. Future Academy; 2018. P. 515–527. doi: 10.15405/epsbs.2018.12.02.56

52. Garrett-Bakelman FE, Darshi M, Green SJ, et al. The NASA Twins Study: A multidimensional analysis of a year-long human spaceflight. *Science*. 2019;364(6436):eaau8650. doi: 10.1126/science.aau8650

ОБ АВТОРАХ

***Андрей Владимирович Тихонов**, канд. биол. наук;
адрес: Россия, 199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3;
ORCID: 0000-0002-2557-6642; eLibrary SPIN: 3170-2629;
e-mail: tixonov5790@gmail.com

Ольга Алексеевна Ефимова, канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0003-4495-0983; eLibrary SPIN: 6959-5014;
e-mail: efimova_o82@mail.ru

Михаил Игоревич Крапивин; ORCID: 0000-0002-1693-5973;
eLibrary SPIN: 4989-1932; e-mail: krapivin-mihail@mail.ru

Ольга Викторовна Малышева, канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0002-8626-5071; eLibrary SPIN: 1740-2691;
e-mail: omal99@mail.ru

Евгения Михайловна Комарова, канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0002-9988-9879; eLibrary SPIN: 1056-7821;
e-mail: evgmkomarova@gmail.com

Арина Вячеславовна Голубева; ORCID: 0000-0003-1613-222X;
eLibrary SPIN: 4610-3686; e-mail: AlikovaAV1504@yandex.ru

Анна Андреевна Пендина, канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0001-9182-9188; eLibrary SPIN: 3123-2133;
e-mail: pendina@mail.ru

AUTHORS' INFO

***Andrei V. Tikhonov**, Cand. Sci. (Biology);
address: 3 Mendeleyevskaya line, Saint Petersburg, 199034,
Russia; ORCID: 0000-0002-2557-6642; eLibrary SPIN: 3170-2629;
e-mail: tixonov5790@gmail.com

Olga A. Efimova, Cand. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0003-4495-0983; eLibrary SPIN: 6959-5014;
e-mail: efimova_o82@mail.ru

Mikhail I. Krapivin; ORCID: 0000-0002-1693-5973;
eLibrary SPIN: 4989-1932; e-mail: krapivin-mihail@mail.ru

Olga V. Malysheva, Cand. Sci. (Biology);
RCID: 0000-0002-8626-5071; eLibrary SPIN: 1740-2691;
e-mail: omal99@mail.ru

Evgeniia M. Komarova, Cand. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0002-9988-9879; eLibrary SPIN: 1056-7821;
e-mail: evgmkomarova@gmail.com

Arina V. Golubeva; ORCID: 0000-0003-1613-222X;
eLibrary SPIN: 4610-3686; e-mail: AlikovaAV1504@yandex.ru

Anna A. Pendina, Cand. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0001-9182-9188; eLibrary SPIN: 3123-2133;
e-mail: pendina@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author